

## 家兔乳頭腫由来の培養細胞株(SP-8)の樹立とその性状-特に低温培養によるウイルス抗原の誘発

著者	白取 治
号	504
発行年	1968
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/18568">http://hdl.handle.net/10097/18568</a>

氏 名 ( 本 籍 )                      い                      と                      お                      治  
白                      取                      さ                      ち

学 位 の 種 類                      医                      学                      博                      士

学 位 記 番 号                      医                      第                      5                      0                      4                      号

学位授与年月日                      昭 和   4   3   年   3   月   4   日

学位授与の要件                      学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴                      昭和 3 3 年 3 月  
東北大学農学部農芸化学科卒業

学位論文題目                      GROWTH AND OTHER CHARACTERISTICS OF A  
CELL LINE(SP-8) ESTABLISHED FROM SHOPE  
VIRUS INDUCED CUTANEOUS PAPILLOMA OF  
DOMESTIC RABBIT.  
( 家兎乳頭腫由来の培養細胞株 ( S P - 8 ) の  
樹立とその性状 - 特に低温培養によるウイル  
ス抗原の誘発 )

( 主 査 )

論文審査委員   教授   石   田   名香雄   教授   山   根                      績

教授   佐   藤   春   郎

## 論 文 内 容 要 旨

腫瘍ウイルスにより腫瘍化された細胞の中に、そのウイルス由来の遺伝物質が比較的長期にわたって存続し、かつその機能的表現を行なうことは、SV40、ポリオーマ、アデノなどの腫瘍ウイルス系について、今日、次第に確立された事実となりつつある。

シヨープ乳頭腫ウイルスを起因体とする一連の腫瘍系、すなわちシヨープ乳頭腫、癌腫系についても、既に30余年前から、ウイルス-宿主細胞間に、いわゆる“masking現象”と呼ばれる特異な関係が存することが広く知られていた。それにもかゝらず、*in vitro*での適当な実験系が樹立されなかつたために、その機序の解析は行なわれなかつた。

シヨープ乳頭腫ウイルスを起因体とする家兎の腫瘍系中、約20年前に癌化したシヨープ乳頭腫を、Rous博士が家兎の筋肉内に移植して今日まで継代して来た可移植性癌V×7癌及びV×2癌が、最近、我々の研究室において*in vitro*での培養が可能になり、従来、継代の途中でウイルス抗原の“喪失”が起つたと考えられて来たV×2癌にも、蛍光抗体法で検出可能なウイルス抗原が存続していることが明らかにされた。筆者は、これらV×癌腫系の培養に続き、シヨープ乳頭腫の培養を試み、培養細胞内のシヨープ乳頭腫ウイルス抗原の動態を、蛍光抗体法を用いて細胞レベルでしらべ、それによつて機能しているウイルスgenomeの存在の有無を検索した。

〔家兎乳頭腫細胞の培養〕 培養手技は、細切したシヨープ乳頭腫組織片を培養瓶ガラス壁に固着させた後、YLEに20%小牛血清と10%tryptose phosphate brothを添加した培地で37℃において静置培養する。培養約3週後より、腫瘍組織片の周囲から細胞が増殖しはじめる。培養は2種類の細胞から構成され、一種は円形ないしは多角形細胞で、他は円柱状細胞である。これら2種類の細胞は不規則に増殖するが、継代を重ねるにつれて培養は、増殖の早い後者の細胞によつて占められるようになり、継代5代以降は、円柱状細胞によつて構成される。これら円柱状細胞の培養は、現在まで80代継代されている。この増殖細胞系は、以後SP-8細胞と略称する。

〔SP-8細胞の性質〕 (i)染色体構成：SP-8細胞は、5代、11代、20代継代時の観察では、いずれも2倍体(染色体数=44)と4倍体(染色体数=88)の2つの種族細胞からなり、前者が後者より2~7倍多かつた。継代を重ねるにつれ4倍体細胞がやゝ増加するが、2倍体細胞の核型は、正常家兎腎臓由来の培養細胞の核型と差異が認められない。又、marker chromosomeも認められない。(ii)移植能：SP-8細胞は、生後1ヶ月前後の仔兎耳部皮下

に戻して移植能をしらべた。10<sup>6</sup>程度の細胞接種で、3日目から細胞接種部位に小さなnoduleを観察したが、これは約一週間で完全にregressする。しかし、細胞接種4日目のregressする前にbiopsyを行い組織標本をつくり観察すると、接種したSP-8細胞と宿主側の組織との接触部位に上皮様細胞の配列を認める。

〔培養細胞におけるウイルス抗原〕 *In vitro* に培養した家兔乳頭腫細胞の細胞内ウイルス抗原の存在を、蛍光抗体法によりしらべた。抗ウイルス血清は、乳頭腫を自然にregressしたワタノウサギの血清と、シヨープ乳頭腫ウイルスでhyper immuneした家兔血清の兩者を用いた。初代培養細胞では、円形ないしは多角形細胞のほとんどすべてに特異的な核内蛍光を認めたが、円柱状細胞では、その一部にのみ核内蛍光を認めたにすぎなかつた。核内蛍光は継代を重ねるにつれて急速に減少し、ほとんどの細胞が円柱状細胞で占められる継代4代以後は、その培養中に全く特異蛍光を認めることが出来なかつた。シヨープ乳頭腫ウイルス抗原の存在を、組織レベルで検索したNoyesとMellorsの成績によると、感染症ウイルスを産生するワタノウサギの乳頭腫では、表層部に強い蛍光を認め、多量のウイルス抗原の存在を示唆しているが、深層部、ことに基底細胞層の近傍では、全くそれを認めることが出来なかつた。同様の関係は、程度の差はあれ家兔乳頭腫組織においても成り立つことが知られている。

若し、円形ないし多角形細胞が表層由来の細胞、円柱状細胞が深層由来の細胞であろうという推定が正しいとすれば、今回、細胞レベルで得られた知見は、組織レベルでの成績と一致するものと思われる。

〔SP-8細胞におけるウイルス抗原の誘発〕 円柱状細胞で占められる継代4代以降は、特異蛍光が全く認められない。しかし、SP-8細胞中になお、シヨープ乳頭腫ウイルスのgenomeがひそんでいるとすれば、ある適当な条件を与え、ウイルスgenomeを賦活化せしめて、ウイルス抗原の合成を可能とすることも出来るかも知れない。一つの試みとして、SP-8細胞(50代)にmonolayerをつくらせてからmaintenance mediumと液交換し、一群は37℃で培養を続け、他の一群では家兔の皮膚温に近い30℃に培養温度を下げて培養を続けた。37℃で培養を続けた群は、全くウイルス抗原が認められなかつたが、30℃の培養環境に移した群では、7日目頃から細胞質に特異的な顆粒状の強い蛍光が認められた。この実験は7回くり返し、6回陽性であつた。

以上、4代以降特異蛍光を示さないまゝ継代されてきたシヨープ乳頭腫細胞を30℃で低温培養することによりウイルスgenomeを発現させ、蛍光抗体法で陽性のウイルス抗原を認め得た。

## 審 査 結 果 の 要 旨

シヨープ乳頭腫の組織培養に成功したばかりでなく、その組織培養の継代中に一回は消失したウイルス抗原を低温で培養することにより誘発に成功し、再び検出に成功した仕事である。

著者らはさきにシヨープ乳頭腫が癌化して家兎に継代されてきた $V \times 7$ 及 $V \times 2$ の組織培養に成功したが、今回は乳頭腫のはりつけ培養から出発して多角形細胞と円柱状細胞の2細胞種からなる細胞系を樹立し、之は継代と共に円柱状細胞でしめられる様になった。

この様に継代培養されるようになった乳頭腫細胞の染色体の構成とか、再び家兎（コットンテイルラビットではなしに）に植えて移植能をしらべた成績には注目すべき結果が得られなかつたが、螢光抗体法によるウイルス抗原の検出で興味ある結果を得た。

即ち継代培養（ $37^{\circ}\text{C}$ ）の初期に出現する多角形細胞には核内にウイルス抗原を証明し、円柱状細胞はその一部に核内抗原を証明した。ところが継代をつづけると前にも述べた様に円柱状細胞が主となり、これから抗原はやがて消失する。さてこの様に抗原のもはや証明されなくなつた細胞を $30^{\circ}\text{C}$ の低温で培養すると $37^{\circ}\text{C}$ の培養では認められない抗原が細胞内に顆粒状に出現する事が明らかになり、しかもその実験結果には再現性が認められた。

以上シヨープ乳頭腫の培養に成功し、殊に1回はマスクされた抗原の誘発に低温培養で成功した点、本論文は学位に値するものと認める。